



TITLE:

Chemical Biology Approaches for Regulating Eukaryotic Gene Expression(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Junetha, Syed Jabarulla

CITATION:

Junetha, Syed Jabarulla. Chemical Biology Approaches for Regulating Eukaryotic Gene Expression. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19261>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-07-31に公開

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	Junetha Syed Jabarulla
論文題目	Chemical Biology Approaches for Regulating Eukaryotic Gene Expression (ケミカルバイオロジー的アプローチによる真核細胞の遺伝子発現制御法の検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA encodes the blueprint of life in the form of nucleotide sequences referred as genes. These genetic information in eukaryotes are tightly synchronized and regulated into a specific transcriptional programme for a particular cell type by various factors such as transcription factors, chromatin remodeling and furthermore recent studies have strongly suggested the functional importance of long non-coding RNAs (lncRNAs). Aberrations at any level of the above mentioned gene regulation could result in dreadful disorders. Treatment strategy employing DNA sequence-specific binding small molecules have new hopes due to its possible reduced side effects. And systems like single -molecule visualization simplifies our understanding of the complex biochemical systems of eukaryotes for designing such small molecules.</p> <p>During the course of my Ph.D., various chemical biology approaches have beenexplored in modulating the eukaryotic gene expression as well as to understand its regulation.</p> <p>1. <u>Targeted Suppression of EVI1 Oncogene Expression by Sequence-Specific Pyrrole-Imidazole Polyamide</u></p> <p>Pyrrole-imidazole (Py-Im) polyamides (PIPs) are a class of small DNA binding molecules that can be designed to target any destined DNA sequence. They can interfere with the binding of transcriptional regulators and modulate gene expression. Human Ectopic viral integration site 1 (EVI1) is an oncogenic transcription factor whose expression is often deregulated in many aggressive forms of cancer. In this chapter, a novel sequence-specific Py-Im polyamide (PIP1) is developed to target base pairs overlapping the REL and ELK1 binding site in the minimal promoter region of EVI1. PIP1 significantly inhibited the expression of EVI1 mRNA in MDA-MB-231 cells and the whole transcriptome analysis showed that the PIP1 treatment affected the EVI1 mediated gene regulation. In vitro assays suggested this polyamide could effectively inhibit the breast cancer cell migration. Taken together, these results indicate that the EVI1 targeted Py-Im polyamide could be an effective gene silencer for cancer therapy.</p> <p>2. <u>A Synthetic Transcriptional Activator of Genes Associated with the Retina in Human Dermal Fibroblasts</u></p>			

HDAC inhibitors such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and trichostatin A (TSA) are potential agents for epigenetic therapy that can induce histone acetylation and facilitate the reexpression of therapeutically important genes. But their mode of action on the target is very non-specific. The sequence specificity to the HDAC inhibitor SAHA can be provided through its conjugation with PIPs. We have developed a library of 32 SAHA-PIP conjugates A to ϕ such that each conjugate can recognize its unique six-base-pair DNA sequence. In this chapter, we have demonstrated the remarkable ability of the conjugate SAHA-PIP X, in specific activation of therapeutically important retinal genes in HDF by histone modifications. SAHA-PIP X enhanced active H3K27 acetylation marks along specific retinal genes and ChIP-seq peaks exhibited enrichment of motif corresponding the SAHA-PIP X binding site (5' -WCGGWW-3'). The obtained results also provide evidence that each SAHA-PIP conjugate from our chemical library can activate its unique gene circuits in HDFs.

3. Single-Molecule Visualization and Characterization of Triple helix formation between the consecutive purines of lncRNA and dsDNA using DNA nanoframe

Triple helix forms in the major groove of the dsDNA by the sequence specific base pairing between the homopolypurine/ homopolypyrimidine sequences in the duplex DNA and the third single stranded triplex forming oligonucleotide (TFO) which can be either DNA or RNA. Biological evidences suggest the presence of such non-canonical structures *in vivo*. Recent studies have shed light on the role of triple helix formation by long non-coding RNA (lncRNA) with genomic DNA that can actively participate in regulating epigenetics. *DBE-T* is a chromatin bound lncRNA, which is selectively expressed in Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) condition and a valuable therapeutic target for treating FSHD. In this chapter, by using our single - molecule visualization method, we have demonstrated the binding of consecutive purines of *DBE-T* to the polypurine tract within the FSHD locus in an anti-parallel orientation generating triple-helical structures. Investigating this mechanism of interaction will provide valuable information at molecular level for developing therapeutics to treat FSHD patients.

In summary, I have employed various chemical biology approaches such as DNA nanotechnology and small molecules to investigate the eukaryotic gene regulation and expression. The outcome of these studies will be focusing on the potential application and development of small molecules as therapeutics in aiding severe human disorders.

(論文審査の結果の要旨)

分子レベルでの遺伝子の発現制御の理解は、現代科学の中でも最も進展が著しい領域であり、様々な分子生物学やケミカルバイオロジーの手法を用いて精力的に解明が試みられている。N-メチルピロール-N-メチルイミダゾール (PI) ポリアミドはネトロプシンやディスタマイシンAといった抗生物質に由来した人工分子であり、DNAの副溝に配列特異的に結合するという興味深い性質をもっている。PIポリアミドは副溝内でヘアピン型となり、PIペアとなった部分でCG塩基対を、IPペアでGC塩基対を、PPペアでATあるいはTA塩基対を特異的に認識する。その結合能、並びに、配列認識能は転写因子に匹敵しているため、PIポリアミドを用いて人為的な遺伝子発現の制御が可能である。そのため、PIポリアミドを用いたDNA配列特異的な遺伝子の発現機構の解明や、新しい遺伝子発現制御剤の設計が試みられている。

申請者は、様々ながんで発現が上昇しているEV11がん原遺伝子の発現を抑制するPIポリアミドを設計し、ヒト培養細胞を用いてそれらの活性を評価した。これまでの研究からEV11のプロモーター領域には、様々な転写因子の結合配列の存在していることが明らかになっており、特に、変異体を用いた実験から最近RELとELK1の結合が注目されている。この結果に基づいてPIポリアミドを数種設計し合成した。これらのPIポリアミドについて、ヒト培養細胞を用いてEV11遺伝子の発現と、抗がん活性を検討した。その結果、設計したPIポリアミドの一種に強い抗がん活性と細胞遊走阻害能があることを確認した。

また、PIポリアミドにHDAC阻害剤を結合させたSAHAコンジュゲートによる遺伝子活性化について検討を行った。SAHA-PIポリアミドコンジュゲート X (SAHA-PIP X) は、DNAマイクロアレイの結果から神経系の遺伝子を活性化することが確認された。さらに、SAHA-PIP Xによる選択的遺伝子発現の活性化について、RT-PCR、ChIP-seqを用いて評価した結果、発現が上昇した遺伝子のプロモーター領域でヒストンのアセチル化が亢進していることを明らかにした。加えて、ヒト皮膚繊維芽細胞において、網膜細胞に関連する遺伝子群の選択的な発現上昇にも成功した。

さらに、long noncoding RNA (lncRNA) の作用機序についてもDNAオリガミ法で作成したDNAフレームを用いて検討を行い、このlncRNAの作用が3本鎖形成による2本鎖領域への結合であることを世界に先駆けて可視化することに成功した。

以上、本論文では、PIポリアミドを用いて遺伝子特異的な発現抑制と活性化、さらには、lncRNAの作用メカニズムについて新しい機構を提案している。本研究成果は最新のケミカルバイオロジーの手法を駆使して評価を行うことによって、初めて成し遂げられた独創的な研究であり、新しい抗がん剤への応用、lncRNAの作用機構の理解に対しても波及効果がある。よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成27年7月30日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降